UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1932-1933 N° 89

RECHERCHE

DES

Diastases Hydratantes et Oxydantes

DANS QUELQUES DROGUES

THÈSE

3 MARS 1933

Présentée et Soutenue Publiquement le 1933

à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université

(MENTION PHARMACIE)

par

Mireille BÉRARD

PHARMACIEN

LICENCIÉE ÈS-SCIENCES

Lauréate de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Examinateurs de la Thèse :

MM. LOBSTEIN, Professeur — *Président*

JADIN — *Juges*

LABORDE — *Juges*

PARIS
Imprimerie R. Lecot
38, rue St-Sabin

RECHERCHE

DES

Diastases Hydratantes et Oxydantes

DANS QUELQUES DROGUES

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. LOBSTEIN, *Doyen,* ✻, ⚗, I ✪, ⚙.
SARTORY, *Assesseur,* C. ✻, I ✪, O ⚙
CUVIER, *Secrétaire*, A ✪.

PROFESSEURS

MM	JADIN, O ✻, I ✪, O ⚙	Pharmacie Chimique.
	A. SARTORY, C. ✻, I ✪, O ⚙.	Bactériologie.
	LAVIALLE, I ✪, ⚙	Botanique.
	LABORDE, ✻, I ✪	Chimie organique.
	VOLMAR, I ✪	Analyse chimique.
	LOBSTEIN, ✻, ⚗, I ✪, ⚙	Matière médicale.
	GUILLAUME, ✻, ⚗, I ✪	Pharmacie galénique.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. BRÆMER, ✻, I ✪, O ⚙.

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	LABORDE, ✻, I ✪	Chimie biologique.
	GUILLAUME, ✻, ⚙, I ✪	Zoologie.
	VOLMAR, I ✪	Chimie minérale.
	LOBSTEIN, ✻, ⚗, I ✪, ⚙	Hydrologie et Hygiène
	BRÆMER, ✻, I ✪, O ⚙	Législation et Déontologie.
	LAPP, A. ✪	Physique.
	COLLARD, I ✪, ⚗	Toxicologie.
	R. SARTORY, ⚙	Cryptogamie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	LAPP, A. ✪	Chimie pharmaceutique
	COLLARD, I ✪, ⚗	Chimie et Physique.
	BOHN, A. ✪	Histoire Naturelle.
	R. SARTORY, ⚙	Bactériologie et Parasitologie.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1932-1933 N° 89

RECHERCHE

DES

Diastases Hydratantes et Oxydantes

DANS QUELQUES DROGUES

THÈSE

Présentée et Soutenue Publiquement le 1933

à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université

(MENTION PHARMACIE)

par

Mireille BÉRARD

PHARMACIEN

LICENCIÉE ÈS-SCIENCES

Lauréate de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Examinateurs de la Thèse :

MM. LOBSTEIN, Professeur — *Président*

JADIN — *Juges*

LABORDE — *Juges*

PARIS
Imprimerie R. Lecot
38, rue St-Sabin

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE,

MORT POUR LA FRANCE

A MA MÈRE

A TOUS MES PARENTS

A MES AMIS

A MON MAITRE,

Monsieur le Doyen honoraire JADIN

Dont la bienveillante autorité
m'a guidée dans mes études,
En témoignage de ma profonde
reconnaissance.

A MON MAITRE,

Monsieur le Doyen LOBSTEIN

Qui m'a inspiré cette thèse, m'a prodigué ses conseils et guidée tout le long de ce travail.

Qu'il veuille bien accepter mes sincères remerciements pour sa grande bonté et croire à mon affection respectueuse et à ma bien vive gratitude.

A MON MAITRE,

Monsieur le Professeur LABORDE

Qui a bien voulu s'intéresser à mon travail et accepter d'être mon juge.
En témoignage de ma sincère reconnaissance.

INTRODUCTION

Depuis 1833, année où PAYEN et PERSOZ réussirent à retirer de la macération d'orge germée, par précipitation alcoolique, la substance active qui saccharifie l'amidon, un nombre considérable de travaux ont été faits sur les diastases.

PAYEN crut pouvoir établir la spécificité de celle qu'il venait d'isoler, car il avait remarqué qu'elle n'agissait pas sur la gomme, l'inuline, l'albumine, etc... Mais en 1837 LIEBIG et WÖHLER découvrent l'émulsine, et en 1845, PIRIA montre que l'émulsine des amandes n'agit pas seulement sur la salicine, mais encore sur son produit d'oxydation, l'hélicine; en outre, quelques années plus tard, KAWALIER établit que cette même émulsine peut dédoubler plusieurs glucosides de constitutions différentes : non seulement l'amygdaline et la salicine, mais encore l'arbutine. La spécificité du ferment n'apparaît donc plus absolue. Toutefois, bien des diastases n'ont d'action souvent que sur un seul corps; dans certains cas, telle diastase qui agit sur un corps n'agit pas sur son isomère optique, ou sur un isomère de constitution très voisine : c'est le cas de l'émulsine qui n'agit pas sur les α glucosides, mais sur les β glucosides, tandis que c'est l'inverse pour la maltase. Il y aurait, suivant la comparaison devenu classique de E. FISCHER, la même relation entre un corps sur lequel agit une diastase et cette diastase, qu'entre une serrure et sa clef;

d'après cet auteur, une action diastasique ne peut se produire qu'à la condition qu'il y ait une relation stéréochimique entre la molécule diastasique et la molécule du corps transformé. Ainsi un ferment attaque non pas un corps chimique, mais une famille de composés chimiques possédant en commun la même fonction, et la spécificité des ferments est celle de n'importe quel réactif chimique.

En 1860, BERTHELOT découvre et isole la sucrase ou invertine dans la macération aqueuse de levure et il écrit : « Je pense que ce végétal n'agit pas sur le sucre en vertu d'un acte physiologique, mais simplement par les ferments qu'il a la propriété de sécréter au même titre que l'orge germée secrète la diastase. Parmi les ferments secrétés, ceux qui sont solubles peuvent être isolés et purifiés jusqu'à un certain point. Au contraire, les ferments insolubles demeurent engagés dans les tissus organisés et ne peuvent en être séparés. Dans les cas énumérés ci-dessus et qui sont relatifs à des ferments solubles, on voit clairement que l'être vivant n'est pas le ferment, mais c'est lui qui l'engendre. Aussi les ferments solubles une fois produits, exercent-ils leur action indépendamment de tout acte vital ultérieur; cette action ne présente de corrélation nécessaire à l'égard d'aucun phénomène physiologique. »

Cette conception si judicieuse, et dont les recherches ultérieures prouvèrent l'exactitude, ne fut pas universellement admise. Ainsi SCHÜTZENBERGER dans son livre *Les Fermentations*, paru en 1875, se montre encore très réservé sur le rôle des ferments solubles et leur rapport avec les organismes-ferments.

Quelques années plus tard, CL. BERNARD signalait le rôle important des diastases : « Les phénomènes dont l'organisme est le théâtre, est-il dit dans ses leçons pu-

bliées en 1878, sont des phénomènes chimiques soumis aux mêmes lois que ceux qui se réalisent en dehors de la vie, mais exécutés par des agents spéciaux. Ces agents sont les ferments solubles : ils président à toutes les oxydations et hydratations de l'organisme. »

Mais les ferments solubles jusqu'alors connus étaient les ferments hydrolysants, c'est-à-dire ceux qui produisent des dédoublements avec fixation d'eau (le terme de ferments hydratants conviendrait peut-être mieux) : ils sont d'ailleurs les plus nombreux. Ce n'est qu'en 1894, que l'existence des ferments oxydants, affirmée par Cl. Bernard et entrevue déjà par Traube en 1853, fut mise en évidence par les belles recherches de G. Bertrand qui, reprenant et précisant l'étude antérieure du chimiste japonais Hikorokuro Yoshida sur le latex du Rhus vernicifera et succedanea, montra le rôle de la laccase dans la formation de la laque, et reconnut en outre la grande diffusion des ferments oxydants dans le règne végétal.

Trois ans plus tard, Edouard Buchner découvrait la zymase alcoolique, diatase dédoublant les sucres fermentescibles pour donner de l'alcool, soupçonnée de même par Traube, recherchée par Berthelot et Cl. Bernard, mais qui n'avait pu être extraite des cellules de levure qui la contiennent. E. Buchner l'obtint en soumettant la levure à un broyage et à une pression assez énergique pour faire exsuder le suc cellulaire.

Depuis lors, les découvertes nouvelles n'ont fait qu'enrichir plus ou moins les trois groupes de diastases ainsi établis, sans introduire vraiment de nouveaux types. En l'état actuel on peut donc envisager des diastases hydrolysantes, oxydantes et dédoublantes, dont le tableau suivant énumère les principales ;

I

DIASTASES HYDROLYSANTES

(hydratantes)

A. — DES SUCRES ET DE LEURS DÉRIVÉS

	Noms des Diastases	Substances sur lesquelles la diastase agit
1) des sucres:	Sucrase	saccharose, raffinose, gentianose, stachyose.
	Maltase	maltose, mélézitose et α glucosides.
	Lactase	lactose.
	Mélibiase	mélibiose.
	Tréhalase	tréhalose.
2) des polyoses:	Amylase	amidon.
	Dextrinase	dextrine.
	Inulase	inuline.
	Mannocellulase	mannocellulose.
3) des glucosides:	Emulsine	β glucosides.
	Myrosine	glucosides sulfurés.
	Tannase	tannin.

B. — DES MATIÈRES GRASSES

1) des monoéthers:	Monobutyrinase	acétate, butyrate, etc., d'allyle, butyle, amyle, etc.; monobutyrine.
2) des graisses:	Lipases	triglycérides.

C. — DES SUBSTANCES PROTÉIQUES

	Noms des Diastases	Substances sur lesquelles la diastase agit
(1) des protéïnes et des protéïdes complexes	Pepsine	albumines et globulines, gélatine.
	Trypsine	paranucléoprotéïdes.
	Papaïne	Certains peptides, etc.
	Protéases végétales.	
2) des produits de dédoublement :	Erepsine	albumoses, peptones.
	Arginase	arginine.
	Uréase	urée.
(3) des Nucléoprotéïdes	Nucléase	nucléïnes.

D. — DIASTASES COAGULANTES (1)

1) des hydrates de carbone :	Pectase	pectine.
2) des substances protéïques :	Fibrineferment	fibrinogène.
	Myosineferment ..	myosinogène.
	Présure	caséïnogène.

(1) Au point de vue pratique on peut avoir intérêt à faire des diastases coagulantes un groupe à part, mais au point de vue théorique, ce ne sont que des diastases hydratantes, elles effectuent en effet des dédoublements par hydratation.

II

DIASTASES OXYDANTES

A. — FIXANT L'OXYGÈNE ATMOSPHÉRIQUE
(Oxydases)

	Noms des Diastases	Substances sur lesquelles la diastase agit
1) des monophénols :	Tyrosinase	tous les corps possédant un OH phénolique.
2) des diphénols :	Laccase	phénols susceptibles de fournir une quinone.

B. — FIXANT L'OXYGÈNE DE L'EAU OXYGÉNÉE

Peroxydiastases ou Peroxydases		les mêmes corps que la laccase.

III

DIASTASES DEDOUBLANTES
(ou Clastases de G. Bertrand)

A) Zymase alcoolique :	Alcoolase	sucres fermentesibles.
B) Catalases :	Catalases	eau oxygénée.

N. B. — Naturellement, cette classification est perfectible et pourra être modifiée au fur et à mesure des recherches nouvelles.

*
**

La nature vraie des diastases ne nous est pas encore parfaitement connue. Malgré l'affaiblissement notable de

l'activité diastasique qui accompagne la pseudo-purification des produits, quelques auteurs se sont efforcés d'arriver à des diastases pures par dissolutions et précipitations successives. En ces dernières années notamment, les ferments solubles ont été purifiés et concentrés par des méthodes chimiques fort ingénieuses dues à WILLSTAETTER et à ses élèves, et qui consistent à arracher en quelque sorte les ferments à leur support en utilisant leurs propriétés acides ou basiques. Si l'on met, par exemple, en contact un ferment acide avec une substance insoluble basique, le ferment acide se fixera en milieu neutre sur la base insoluble, il sera alors soustrait à toutes les impuretés solubles; si on le porte ensuite en milieu acide, le ferment sera remis en solution. Il a été possible ainsi de précipiter et de redissoudre nombre de ferments. Comme base insoluble, WILLSTAETTER a choisi des alumines hydratées; comme acide ou plutôt sel insoluble, le kaolin. Certains ferments, à propriétés insuffisamment accusées, seront entraînés successivement par l'alumine et le kaolin : la purification ne s'en fait pas moins, parce que ce sont alors les impuretés qui sont spécifiquement retenues par l'un ou l'autre corps insoluble; le ferment reste en solution, tandis que les impuretés sont soustraites.

Contre la conception purement chimique des diastases, considérées comme principes définis, ARTHUS, reprenant une hypothèse émise par JAGER, avait conçu sur la « nature des enzymes » une théorie entièrement physique, qui substituait « la notion d'enzyme-propriété à la notion d'enzyme-substance », conception originale, mais qui eut peu de succès.

Plus concrète est la conception de G. BERTRAND. Ce savant, en étudiant la laccase, remarqua la présence constante du maganèse, et ce métal, loin d'être une impureté à éliminer dans l'étude de l'action diastasique, lui apparut au contraire en relation avec l'activité de l'oxydase : « dans les oxydations effectuées par la laccase, écrit G. BERTRAND, il entre en jeu un système de deux substances complémentaires; l'une, représentée par le manganèse, suffit à produire la réaction considérée et pourrait, à cause de cela, être appelée la *complémentaire active;* l'autre, de nature organique, altérable par la chaleur, est la *complémentaire activante*. Cette conception ne doit pas être restreinte à la laccase, je pense qu'on peut l'étendre à un grand nombre, sinon à toutes les substances diastasiques. » Et d'autre part, il déclarait : « Désormais il faudra tenir compte, dans l'étude des ferments solubles, non seulement de la substance organique et très altérable à laquelle nous attachions jusqu'ici toute l'idée du ferment soluble, mais encore de celles qu'on pourrait appeler coferments, ici minérales, là peut-être organiques, qui feraient avec la première le système véritablement actif. »

De fait, la luzerne, par exemple, renferme une oxydase très peu active et l'analyse indique qu'elle ne contient qu'une quantité de manganèse inférieure à 1/50.000. Or, il est facile de donner à cette oxydase une grande activité par l'addition de faibles quantités d'un sel de manganèse.

Depuis, l'hypothèse de G. BERTRAND a reçu bien des confirmations : CONNSTEIN, HOYER et WARTENBERG étudiant la lipase du ricin, expliquent les contradictions et les insuccès des précédents chercheurs par le fait que cette diastase ne peut agir en milieu neutre: l'addition d'un acide

est indispensable à son fonctionnement. HARDEN et YOUNG découvrent dans le suc de levure pressée une substance sans laquelle la zymase n'a pas d'action, substance non dialysable et non détruite par la chaleur et qui, pour ces auteurs, paraît être un phosphate alcalin, et pour BUCHNER et ANTONI une combinaison organique phosphorée. VINES, au cours de ses recherches sur les diactases protéolytiques des végétaux, remarque que la diastase peptonisante des graisses est nettement activée par l'addition de sel marin. EFFRONT avait remarqué que la teneur en diastases des feuilles de pommier variait notablement aux différentes heures de la journée : le matin, au soleil, les principes actifs étaient particulièrement abondants; il semblait difficile d'expliquer ces variations par la destruction suivie de la formation d'une nouvelle quantité de diastase. L'auteur, de déductions en déductions, en est arrivé à conclure que les variations de l'activité des feuilles ne correspondaient nullement à un va-et-vient des diastases elles-mêmes, mais à la présence ou à l'absence de co-ferments.

Il semble donc bien nécessaire pour le ferment d'être associé plus ou moins étroitement à un composé inorganique simple, et ces éléments métalliques, ces « co-ferments », associés au complexe colloïdal, seraient les agents actifs de la catalyse.

Récemment (1923 et 1926) HUGOUNENQ et LOISELEUR ont réalisé des oxydases artificielles, en parfait accord avec les faits établis par G. BERTRAND, auxquels ils apportent un complément d'une objectivité saisissante : en ajoutant une solution de $MnCl^2$ à une pseudo-solution de glycogène pur, le cation se fixe sélectivement sur la micelle. Si l'on alcalinise, l'hydrate manganeux reste fixé sur la micelle; le colloïde obtenu est précipité par l'alcool. Ce

glycogène manganique détermine l'oxydation presque instantanée du pyrogallol, du gaïacol, de la benzidine : il reproduit donc, avec leur intensité et leurs modalités, l'action des oxydases. Cette expérience met en évidence que la partie d'un électrolyte engagée sur un colloïde est susceptible de manifester une grande activité, et que, réciproquement, seule doit être considérée comme active la partie d'un électrolyte engagée sur une micelle.

En réalité, un tel essai de synthèse d'oxydase avait déjà été tenté par Dony Henault en 1908.

Au demeurant, il n'existe aucune diastase, parmi les groupes actuellement connus, qui produise une réaction impossible à réaliser au moyen de réactifs chimiques. Les acides et les alcalis étendus fournissent toutes les gammes de l'hydrolyse, aussi bien pour les sucres que pour les graisses et les substances protéïques; la chaux produit la coagulation de la pectine; les sels de manganèse se prêtent à toutes les oxydations directes, de même qu'à la réduction de l'eau oxygénée et à l'oxydation indirecte par l'atome d'oxygène libéré, etc...

L'assimilation des réactions diastasiques aux réactions chimiques est donc possible. Seulement les concentrations auxquelles nous faisons agir les réactifs sont toujours de beaucoup supérieures à celles qu'ils possèdent quand ils accompagnent une diastase, ou bien, à la même concentration, la réaction est infiniment plus lente.

Ainsi, selon la conception de Berzélius qui, à l'origine, avait déjà comparé les réactions diastasiques aux phénomènes dits catalytiques, les diastases apparaissent comme des catalyseurs grâce auxquels une très petite

quantité d'un corps actif peut produire une action considérable, la diastase n'entrant pas elle-même en réaction.

*
**

L'activité des diastases, nulle ou très faible de 0° à 10° ou 15°, augmente rapidement avec la température jusqu'à une température optima, variable avec chaque diastase, généralement voisine de 35° à 40°. Le froid qui les empêche d'agir, ne les détruit pas.

Elles sont détruites par la chaleur à une température inférieure à 100° : elles sont donc détruites par la vapeur d'eau; elles le sont aussi par l'alcool bouillant ou les vapeurs d'alcool (soit 80°). D'après les recherches récentes de Jonesco-Matiu, elles le seraient également à froid par certains carbures, tel l'acétylène. Les radiations ultra-violettes les atténuent plus ou moins rapidement (Agulhon).

Elles sont solubles dans l'eau et la glycérine. L'alcool fort les précipite à froid, sans les détruire, et, après précipitation par l'alcool, elles peuvent être dissoutes dans l'eau. Elles sont fixées par les précipités floconneux, sont peu dialysables, et enfin sont insensibles à l'action de la plupart des antiseptiques.

Parmi les conditions chimiques qui influent le plus nettement sur l'activité des diastases, il convient de citer la réaction du milieu : la maltase par exemple est inactive en milieu alcalin (Bierry et Terroine); d'après Buchner et Rapp une faible alcalinité accélère l'action de la zymase, mais une très légère acidité l'empêche.

Certaines substances peuvent contrarier aussi leur action : ainsi le citrate de soude a une action inhibitrice sur les diastases coagulantes (Arthus).

Les produits formés au cours des phénomènes diastasiques ont également une action importante sur ces phénomènes. En s'accumulant au contract des diastases, ils ralentissent progressivement leur activité, parviennent dans certains cas à l'inhiber et peuvent même la réverser, transformant une action hydrolysante, c'est-à-dire analysante, en action synthétisante. L'action des diastases peut donc être réversible, la réaction obéissant à la loi des masses (Guldberg et Waage), avec des modalités résultant de la vie de la cellule. C'est ainsi que Croft Hill a, en 1898, pour la première fois, réalisé la synthèse de l'isomaltose aux dépens du glucose grâce à la maltase; Pottevin fit la synthèse de la trioléïne par action de la lipase pancréatique sur un mélange de glycérine et d'acide oléïque. Mais c'est surtout Bourquelot et ses élèves (Hérissey et Bridel) qui ont démontré d'une façon péremptoire que toute une catégorie de ferments ont une action rigoureusement réversible, et ils effectuèrent par voie diastasique la synthèse d'un grand nombre de glucosides et même de sucres.

Ces faits, montrant que les fermentations sont aussi réversibles que les équilibres d'éthérification, — ce qui pouvait se concevoir *à priori* —, achèvent de faire rentrer les actions des ferments dans le cadre des réactions chimiques. Les exceptions qui ont pu se rencontrer s'expliquent parfaitement : si l'inversion du saccharose n'est pas réversible, la cause n'en tient pas aux propriétés de l'invertine, mais à l'extrême instabilité de ce sucre.

D'autre part, au point de vue biologique, ces faits expliquent une partie au moins des synthèses : le mécanisme de la formation des réserves dans les graines, par

exemple, et celui de leur digestion au moment de la germination, seraient exactement l'inverse l'un de l'autre.

*
**

Toutes les diastases sont le produit d'une vie cellulaire et les méthodes de recherche doivent donc viser à les extraire de la cellule et à les mettre en évidence dans la solution obtenue.

Il est un premier cas où l'on se trouve en présence d'une solution diastasique toute faite : c'est celui des sécrétions naturelles. Tels sont, dans le domaine végétal : le latex du Carica papaya qui renferme la papaïne, dont l'action diastasique fut l'objet des recherches de Wurtz et Bouchut; le suc gommo-résineux du Rhus vernicifera qui a fourni la laccase étudiée par G. Bertrand; le suc gommeux des acasias, renfermant de même des diastases oxydantes (oxydases et aussi peroxydases); de même le latex des Hévéas à caoutchouc.

Mais les sécrétions naturelles sont loin d'être la règle, quand il s'agit de la recherche des diastases, et on devra le plus souvent extraire celles-ci des cellules qui les renferment. La méthode d'extraction la plus fréquemment employée consiste dans la dissolution à l'aide de l'eau pure ou encore de l'eau salée (contenant 5 à 10 gr. de NaCl pour 1000) qui dissout les globulines insolubles dans l'eau pure et pouvant servir de support aux diastases.

Les tissus, convenablement divisés, sont mis à macérer dans l'eau et pour empêcher une contamination par des bactéries, qui pourraient intervenir plus tard dans les transformations observées et fausseraient les résultats, on antiseptise le milieu par addition de chloroforme, ou de to-

luène, ou de fluorure de sodium à la dose de 1 à 2 p. 100 (le fluorure de sodium ne convient pas dans le cas des diastases coagulantes pour lesquelles la présence de sels de calcium est indispensable, et aussi dans le cas de diastases protéolytiques, car la fibrine, la caséïne, l'ovalbumine sont dissoutes en présence de F Na), ou d'essence de moutarde, qui arrêtent les fermentations vitales et sont sans influence sur les fermentations chimiques.

On peut encore extraire les diastases par plasmolyse à l'aide de la glycérine (c'est ainsi que G. BERTRAND et BOURQUELOT se sont procuré les diastases oxydantes des champignons) ou de l'éther ou du chloroforme. DASTRE a recommandé également le procédé qu'il dénomma « dialyse chloroformique » et qui consiste dans une exosmose du suc cellulaire sous l'influence des vapeurs de chloroforme.

Enfin, il est des cas où il peut être nécessaire d'effectuer un broyage des cellules suivi d'une expression énergique : on sait que c'est ainsi que BUCHNER réussit à extraire la zymase des cellules de levure.

Quel que soit le procédé employé, il reste à caractériser dans la solution obtenue la diastase cherchée. Le moyen le plus simple et le plus général consiste évidemment à mettre la diastase, supposée présente, en rapport avec le corps (ou l'un des corps, judicieusement choisi) sur lequel elle manifeste son activité, les causes d'erreurs possibles dans l'interprétation étant éliminées par le contrôle au moyen de témoins convenables.

Il n'existe pas de bonnes réactions histo-chimiques communes à toutes les diastases. WIESNER a proposé une technique consistant à exposer quelques temps les coupes végétales aux vapeurs d'acide chlorhydrique; on les chauffe

ensuite légèrement : dans ces conditions certaines diastases se colorent en violet. Mais, d'une part, toutes les diastases ne produisent pas cette réaction, et d'autre part, on ne peut avoir la certitude, lorsque le tissu se colore ainsi en violet, que la coloration est bien due à l'existence d'une diastase, la présence ou la formation de furfurol déterminant la même coloration.

La recherche de la myrosine au moyen du réactif de Millon donnant une coloration rouge ne saurait non plus être généralisée : le réactif de Millon donne, avec toutes les matières protéïques, une semblable coloration, due à la présence de noyaux phénoliques.

*
**

On sait que les diastases jouent aujourd'hui un rôle important dans les recherches biologiques. Leur étude a permis à Bourquelot et à ses collaborateurs d'instituer, par sa généralisation, une technique nouvelle : la méthode biochimique, dont les résultats, notamment pour la connaissance des glucosides végétaux, sont aussi nombreux qu'importants.

Dans la cellule vivante, les diastases jouent un rôle capital : comme le déclarait Cl. Bernard dans ses leçons de 1878, « elles constituent ce qu'il y a de particulier dans les procédés de la nature vivante, puisque le fond des phénomènes est le même que dans la nature inorganique. Ce n'est pas trop s'avancer que de dire qu'elles contiennent en définitive le secret de la vie ».

Elles effectuent des réactions d'hydrolyse, de rupture de molécules, et aussi de synthèse, de coagulation, d'oxydation ou de réduction, analogues ou identiques à celles que

l'expérience permet de constater, — sans rien exagérer toutefois : ainsi, de l'obtention de réactions peroxydasiques dans certaines cellules, en déduire qu'il y a là des peroxydases ayant pour rôle physiologique de provoquer des oxydations dans ces cellules, serait sans doute aussi aventuré que d'admettre que le rôle physiologique des sulfates dans les cellules est d'y précipiter le baryum.

Très souvent les diastases se forment suivant l'état de développement des organes : ainsi les semences d'orge avant la germination sont très pauvres en amylase, mais dès que la germination commence, la diastase est produite activement.

Quand une plante renferme un glucoside, elle renferme généralement, et dans des cellules différentes, la diastase susceptible de le décomposer. C'est pourquoi Bourquelot indique, dans la recherche biochimique des glucosides, lorsque les résultats sont négatifs avec l'émulsine, d'employer, comme réactif hydrolysant, la poudre de la plante même.

Lorsque la plante se dessèche, il arrive que la diastase et le glucoside, qui étaient localisés dans des cellules distinctes, entrent en contact et le glucoside se dédouble en sucre réducteur et aglycone; dès lors, les drogues qui doivent leur activité à des glucosides peuvent perdre une grande partie, sinon la totalité de leurs propriétés par la dessiccation, les glucosides actifs étant décomposés en produits indifférents. D'autres drogues renfermant des complexes tanniques se colorent sous l'action de diastases oxydantes émigrant de même et déterminant la formation de rouges phlobaphéniques : le complexe primitif peut se trouver simultanément modifié dans son action physiologique, si bien que la drogue desséchée ne présente plus les

propriétés de la drogue fraîche, Les alcaloïdes, dans les plantes, sont ainsi très souvent combinés à des tanins et des sucres, ces derniers agissant sans doute comme solvants et empêchant, dans le végétal vivant, la précipitation de l'alcaloïde par le tanin; mais, au cours de la dessiccation et sous des actions diastasiques, cet équilibre peut être rompu, le tanin est oxydé, un peu d'alcaloïde est libéré : tel est le cas de la noix de Kola, dont le composé tanno-alcaloïdique (Kolatine-caféïne) existant dans la noix fraîche disparaît pendant le dessiccation de la noix pour donner le rouge de Kola, comme l'ont mis en évidence les recherches de Goris.

⁂

Il nous a paru intéressant, à ce point de vue, de rechercher l'existence de diastases oxydantes et de quelques diastases hydrolysantes (émulsine, sucrase, amylase, maltase, uréase) dans les drogues les plus courantes, les unes contenant des principes actifs hydrolysables ou oxydables, les autres n'en renfermant pas, et certaines d'entre elles datant de plus de cinquante ans. C'est l'objet des chapitres suivants, dont chacun a trait à la recherche d'une des diastases précitées.

CHAPITRE PREMIER

RECHERCHE DE L'EMULSINE
(ou Synaptase)

Depuis la découverte de l'émulsine par LIEBIG et WŒHLER, en 1837, dans les amandes amères, cette diastase a été signalée dans un grand nombre de végétaux. On sait qu'elle existe dans les amandes douces également (bien que celles-ci ne renferment pas d'amygdaline), dans les feuilles de laurier-cerise, dans le latex du Manihot. GUIGNARD a constaté sa présence dans diverses orchidées et BOURQUELOT dans beaucoup de champignons, surtout dans ceux qui parasitent les arbres ou vivent sur le bois (*Polyporus sulfureus, Armillaria mellea, Polyporus fomentarius*) : elle servirait, chez ces derniers, à dédoubler les glucosides (coniférine, esculine, populine, salicine, etc...) que renferment l'écorce, le cambium et même la partie ligneuse. BOURQUELOT l'a trouvée encore dans les deux moisissures les plus répandues, le *Penicillium glaucum* et l'*Aspergillus niger,* ainsi que dans plusieurs lichens (*Usnea, Physcia ciliaris*...). Elle a été mise en évidence dans les graines de moutarde noire par ASTRUC et MOUSSERON. Les élèves de LOBSTEIN l'ont toujours décélée dans les divers organes végétaux ou plantes par eux étudiés : fruits de l'*Uvaria catocarpa* (M. Coisnard), du *Torreya nucifera* (M. Roger Trenz), du *Quisqualis indica* (Mme Lagrange);

tiges et feuilles du *Toddalia aculeata* (M. Hesse); racines du *Cnestis polyphylla* (M. Kovelman); du *Chamœrops humilis* (M. Weill); tubercules de *Stemona tuberosa* (M. Grumbach); *Drosera rotundifolia* (M. Moussli), etc...

L'émulsine a été recherchée en utilisant sa propriété d'hydrolyser l'amygdaline, d'où mise en liberté d'acide cyanhydrique, facilement décelable avec le papier picro-sodé indiqué par Guignard. Ce papier rougit en effet en présence d'acide cyanhydrique par suite de la formation d'acide isopurpurique.

D'après Auld, l'optimum d'action de l'émulsine se manifeste au voisinage de la neutralité. Mais de très faibles doses d'acides peu dissociables ne paraissent pas diminuer son action; par contre, de faibles quantités d'alcali se montrent nuisibles.

Technique.

Préparation du papier picro-sodé. — Des bandes de papier sont trempées d'abord dans une solution d'acide picrique à 1 p. 100, puis, après dessiccation à l'air libre, dans une solution de carbonate de soude à 10 p. 100. On laisse sécher et on conserve dans un flacon bouché, à l'abri de la lumière.

Recherche dans la drogue. — Dans un flacon de 30 à 40 cm^3, à large goulot, on met 2 à 3 gr. de poudre végétale en essai, une pincée d'amygdaline et 10 cc environ d'eau distillée. On agite et on fixe au-dessous du bouchon une bandelette de papier picro-sodé humide, qui pend librement dans l'atmosphère du flacon sans toucher le liquide.

L'hydrolyse et par suite la réaction se produit à froid, mais plus rapidement à la température de 35-40°. C'est ce dernier mode que nous avons choisi en plaçant les flacons dans une étuve réglée à 37°.

Témoins. — Dans un flacon témoin on ne met pas d'amygdaline, toutes choses égales d'ailleurs. Dans un autre on met uniquement l'amygdaline avec de l'eau distillée. Le papier picro-sodé ne doit rougir ni dans l'un, ni dans l'autre de ces deux flacons.

Nota. — L'hydrogène sulfuré (qui pourrait se produire au cours de la macération de la drogue) est sans action sur le papier picro-sodé préparé tel qu'il vient d'être indiqué. Mais si on substitue à la solution de carbonate de soude une solution de soude, le papier ainsi obtenu pourrait rougir au contact de H^2S, par réduction de l'acide picrique en acide picramique en milieu alcalin.

Résultats expérimentaux.

Les résultats obtenus avec les diverses drogues en essai sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau I) :

Tableau I. — Recherche de l'émulsine.

2 croix (++) indiquent une coloration rouge sang du papier picrosodé.

1 croix (+) indique une coloration rouge pâle du papier picrosodé.

DROGUES EN ESSAI	Examen au bout de : 24 heures	40 heures
Belladone (feuilles)	++	
Bourdaine (écorce)	++	
Cannelle de Ceylan (écorce)		+
Cascara sagrada (écorce)	+	++
Cevadille (graines)	++	
Ciguë (feuilles)	++	
Colchique (bulbe détuniqué)	—	—
Colchique (tuniques du bulbe frais)	+	
Colchique (semences)	++	
Coloquinte (fruit sans épicarpe)		+
Coque du Levant (fruit)	++	
Cubèbe (fruit)	++	
Digitale (feuilles)	++	
Ergot de seigle	++	
Fève de Calabar		+
Fève de St-Ignace	—	—
Fougère mâle (rhizome)		+
Hellébore blanc (rhizome)	++	
Ipéca (racine)	++	
Iris (rhizome)	+	++
Jalap (racine) Echant. I		+
Jalap (racine) Echant. II	+	
Jusquiame (feuilles)	++	
Noix vomique		+
Quinquina rouge	—	—
Réglisse (racine et rhizome)	+	++
Rhubarbe de Chine (rhizome)	+	++
Scille (écailles du bulbe)	+	++
Séné (folioles)	++	
Stramoine (feuilles)	++	

Conclusions.

Les vingt-huit drogues que nous avons examinées, appartenant à dix-sept familles différentes, renferment toutes de l'émulsine, sauf le quinquina et la fève de Saint-Ignace. Toutes contiennent des glucosides ou des complexes alcaloïdiques, à l'exception de la cannelle, du cubèbe, de la réglisse; la glycyrrhizine qui existe dans cette dernière n'est pas, comme on l'avait cru, un glucoside, mais elle s'hydrolyse en fixant deux molécules d'eau pour donner de l'acide glycyrrhétinique et de l'acide glycuronique.

D'une façon générale, les feuilles et les fruits paraissent être plus riches en ferment que les écorces, les rhizomes et les racines.

Dans certaines poudres du commerce, la diastase peut être atténuée, sinon détruite, par la température à laquelle eut lieu la dessiccation. La lumière, même diffuse, peut à la longue atténuer aussi la diastase; mais le temps seul ne paraît pas la détruire : certaines poudres essayées existaient en effet dans le droguier de la Faculté depuis plus de cinquante ans.

La dessiccation du quinquina se fait ordinairement, partie au soleil, partie dans de vastes étuves « Sirocco » où elles séjournent de douze à vingt-quatre heures à une température qui ne doit pas, en principe, dépasser 80°, mais il n'est pas certain que ce maximum ne soit pas par-

fois dépassé et que, dans ces conditions, les diastases ne soient pas détruites.

La racine d'ipéca, qui appartient à la même famille, contient de l'émulsine. Et de même si la fève de Saint-Ignace qui a servi à nos essais s'est montrée privée d'émulsine, par contre la noix vomique en renferme.

La recherche de cette diastase dans la poudre de colchique du commerce, faite avec le bulbe détuniqué, a été négative, mais les tuniques externes brunâtres prélevées sur le bulbe frais donnent une réaction positive, et de même les graines. Or le gluco-alcaloïde *colchicine* se trouve surtout dans les graines, et d'autre part, il est localisé, chez le bulbe frais, précisément dans les tuniques et aussi dans les cellules entourant immédiatement les faisceaux libéro-ligneux. Les bulbes secs que l'on trouve dans le commerce ne donnent, en ce qui concerne la colchicine, qu'une réaction microchimique faible et souvent diffuse.

La présence d'émulsine dans les folioles de séné explique que cette drogue perde avec le temps une partie de son activité thérapeutique, ainsi que l'a mis en évidence Maurin. Les composés oxyméthylanthraquinoniques y sont en effet ou à l'état libre ou à l'état de glucosides. Si le temps n'abaisse que fort peu la richesse en oxyméthylanthraquinones totaux, par contre les dérivés anthraquinoniques à l'état libre progressent sensiblement au détriment de ceux qui sont combinés à l'état de glucosides à mesure que la plante vieillit; or ces derniers sont plus actifs.

CHAPITRE II

RECHERCHE DE LA SUCRASE
(ou Invertine, ou Invertase)

Ce ferment, isolé pour la première fois par BERHELOT en 1860, avait été nommé par ce savant « ferment glucosique ». En 1864 BÉCHAMP l'appela « zymase », nom qu'il remplaça ensuite par celui de « zythozymase ». Le nom d' « invertine » lui fut donné par DONATH en 1875, celui d' « invertase » par GREEN, et DUCLAUX, proposant de désigner chaque ferment soluble en ajoutant la désinence « ase » au corps sur lequel on a observé pour la première fois son action, l'appela sucrase.

Les différentes espèces de levure qui déterminent la fermentation alcoolique du sucre de canne (*saccharomyces cerevisiae*, et variétés) secrètent de la sucrase. Il en est de même de beaucoup de moisissures : GAYON l'a signalée dans l'*Aspergillus niger*, le *Mucor racemosus*, le *Penicillium glaucum;* BOURQUELOT, dans le *Penicillium Duclauxi;* DE BARY, dans une pezize (*Sclerotinia sclerotiorum*). Le saccharose étant un aliment très répandu et, d'autre part, les végétaux, comme les animaux d'ailleurs, ne pouvant assimiler directement le sucre de canne, la sucrase doit être fréquente dans les plantes. On ne l'a pourtant signalée que rarement : elle existe dans la tige de betterave et même dans la racine (c'est bien à tort que l'on cite la racine de betterave comme un exemple de plante à sucre dépourvue, fort heureusement, dit-on, de sucrase : la pulpe réduite en bouillie intervertit bel et bien, quoiqu'avec lenteur, le sac-

charose qu'elle renferme); KOSSMANN l'a rencontrée dans les bourgeons et les feuilles des jeunes arbres; BÉCHAMP, dans les pétales du *Robinia pseudacacia;* VAN TIEGHEM dans le pollen de certaines plantes; KJELDAHL dans l'embryon de l'orge germé; ASTRUC et MOUSSERON dans les graines de moutarde noire.

Pour déceler la sucrase nous avons utilisé son action hydrolysante sur le saccharose et nous avons déterminé par la méthode de G. Bertrand la quantité de sucre réducteur produit.

La sensibilité de la sucrase aux acides a fait l'objet des recherches de KJELDAHL, de A. FERNBACH, de O'SULLIVAN et THOMPSON, de VON HUDSON, de SÖRENSEN.

KJELDAHL avait montré qu'une petite quantité d'acide augmente l'action de la diastase, mais que l'addition d'une forte dose la diminue. FERNBACH, reprenant ces expériences avec plus de précision, établit que l'influence favorable de l'acide passe par un maximum au delà duquel l'effet de la diastase diminue pour faire place peu à peu à l'action inversive de l'acide. Il y a donc une acidité optima. Mais comme, au moment des études de FERNBACH, on ne connaissait que l'acidité totale, cet auteur trouve que l'optimum d'acidité varie considérablement suivant la nature de l'acide employé (dose optima d'acide sulfurique: 23 milligr. par litre; d'acide tartrique : 1 gr.; d'acide acétique : 10 gr), l'action des acides étant sensiblement proportionnelle à leur degré d'ionisation et au nombre d'ions H libres présents dans la solution.

Cette constatation est corroborée par les recherches de O'SULLIVAN et THOMPSON qui ont montré que l'acidité

totale optima est plus faible pour des températures élevées; or, on sait l'influence considérable de l'élévation de température sur la dissociation électrolytique.

Von Hudson, expérimentant avec l'acide chlorhydrique, établit que le maximum d'action est atteint rapidement pour une concentration égale à 0,002 normale et qu'une décroissance commence à apparaître à partir d'une concentration 0,06 normale.

Sörensen a calculé la concentration des ions H libres présents dans la solution au moment de la concentration optima de l'acide sulfurique et d'autres acides forts. Il l'a trouvée la même pour tous les acides considérés et égale à 0,00003.

Quoi qu'il en soit, nous n'avons pas cherché à donner au milieu une réaction optima, et nous nous sommes bornée à mettre les drogues pulvérisées dans l'eau distillée en présence du saccharose.

Technique.

1° Dans une fiole jaugée de 100 cc, on introduit 3 gr. de la drogue, très exactement pesés, et une solution de saccharose pur à 1 p. 100 jusqu'au trait de jauge. On bouche, agite et place à l'étuve à 37°.

Deux autres fioles de même capacité constituent les témoins :

Témoins :

2° Dans l'une on met exactement le même poids de la drogue (3 gr.) et on remplit jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

3° L'autre est remplie simplement de la solution de saccharose à 1 p. 100.

La solution de saccharose est faite au moment du

besoin. Les trois fioles sont préparées et placées simultanément à l'étuve où elles restent rigoureusement le même temps. Les dosages sont faits sur une portion convenable du liquide aussitôt la sortie de l'étuve et à la suite; après déduction des résultats 2° et 3° du résultat 1°, on a la réduction due à l'action de la sucrase sur le saccharose.

Pour éviter des fermentations étrangères (constatées d'ailleurs dans les premiers essais), nous nous sommes servie d'eau toluénée, le toluène n'ayant pas d'action sur la liqueur cupro-alcaline.

Avec certaines drogues, le dosage n'a pu être fait qu'après défécation du liquide au moyen de l'acétate de plomb, l'excès de plomb étant ensuite éliminé par addition de carbonate de soude (dans le calcul il est évidemment tenu compte de la dilution due à cette défécation).

Nos essais se sont limités aux drogues suivantes :

Belladone (feuilles).
Bourdaine (écorce).
Cascara (écorce).
Digitale (feuilles).
Ipéca (racines).
Jalap (tubercules).
Jusquiame (feuilles).
Rhubarbe de Chine (rhizome).
Stramoine (feuilles).

Ces drogues, finement pulvérisées, étaient renfermées (25 à 30 gr. environ) dans des flacons que l'on agitait soigneusement avant chaque pesée, pour rendre la poudre très homogène.

Résultats expérimentaux.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau II,

Tableau II — RECHERCHE DE LA SUCRASE

DROGUES EN ESSAI	Séjour à l'étuve	Volume prélevé pour le Dosage	Volume de liqueur de MnO^4K réd.	Réduction due à la sucrase : pour le volume prélevé	Réduction due à la sucrase : calculée pour un prélèvement de 20 cc	OBSERVATIONS
			cc	cc	cc	
1. Belladone (3 gr.) + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc. ..... 1er essai	42 H	10 cc	12.90	11.87	23.75	L'essai I est fait sans toluène ni défécation; l'essai II avec toluène et en déféquant.
2e essai	25	10	17.40	16.05	32.1.	
2. Belladone (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc. ..... 1er essai	42	10	0.40			
2e essai	25	10	0.60			
3. Solution de saccharose à 1 % ..... 1er essai	42	20	1.25			
2e essai	25	20	1.50			
1. Bourdaine (3 gr.) + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc.	45	5	7.90	4.33	17.32	Essai avec toluène, sans défécation.
2. Bourdaine (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc. ..	45	5	3.30			
3. Solution de saccharose à 1 %	45	20	1.10			
1. Cascara (3 gr.) + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc.	45	5	5.10	2.63	10.52	Essai avec toluène, sans défécation.
2. Cascara (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc. ..	45	5	2.20			
3. Solution de saccharose à 1 %	45	20	1.10			
1. Digitale (3 gr.) + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc. ..... 1er essai	20	5	11.44	8.915	35.66	Les essais ont été faits avec toluène et défécation.
2e essai	19	5	11.45	9.64	38.56	
2. Digitale (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc. ..... 1er essai	20	5	2.20			Au 1er essai le filtrat était un peu acide, nous avons, dans le 2e essai, ajouté, pour le séjour à l'étuve, une pincée de CO^3 Ca.
2e essai	19	5	1.50			
3. Solution de saccharose 1er essai	20	20	1.30			

DROGUES EN ESSAI	Séjour à l'étuve	Volume prélevé pour le Dosage	Volume de liqueur MnO^4K réd.	Réduction due à la sucrase : pour le volume prélevé	Réduction due à la sucrase : calculée pour un prélèvement de 20 cc	OBSERVATIONS
1. Ipéca (3 gr.) échantillon I. + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc.	48 H	10 cc	8.20 cc	5 cc	10 cc	Poudre d'Ipéca fournie par la droguerie.
2. Ipéca (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc.	48	10	3.20			
3. Solution de saccharose à 1 %	48	20	néant			
1. Ipéca (3 gr.) échantillon II. + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc.	24	10	8.65	4.25	8.50	Racine d'Ipéca pulvérisée au laboratoire.
2. Ipéca (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc.	24	10	4.40			
3. Solution de saccharose à 1 %	24	20	néant			
1. Jalap (3 gr.) échant. I. + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc. — 1er essai	21	10	7.5	0.05	0.10	Le premier essai est fait sans toluène; le second avec toluène; tous deux sans défécation.
1. Jalap (3 gr.) échant. I. + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc. — 2e essai	45	5	4.25	0.40	1.6	
2. Jalap (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc. — 1er essai	21	10	6.95			
2. Jalap (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc. — 2e essai	45	5	3.6			
3. Solution de saccharose à 1 % — 1er essai	21	20	0.95			
3. Solution de saccharose à 1 % — 2e essai	45	20	1.1			
1. Jalap (3 gr.) échantillon II. + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc.	30	5	3.27	0.55	2.20	Avec toluène, sans défécation.
2. Jalap (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc.	30	5	2.50			
3. Solution de saccharose à 1 %	30	20	0.90			

Tableau II. — RECHERCHE DE LA SUCRASE (suite)

DROGUES EN ESSAI		Séjour à l'étuve	Volume prélevé pour le dosage	Volume de liqueur MnO_4K réd.	Réduction due à la sucrase : pour le volume prélevé	Réduction due à la sucrase : calculée pour un prélèvement de 20 cc	OBSERVATIONS
			cc	cc.	cc	cc	
1. Jusquiame (3 gr.) + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc.	1er essai	42 H	10	11.10	9.275	18.55	Le premier essai a été fait sans toluène ni défécation; le second avec toluène, en déféquant.
	2e essai	25	10	17.30	15.05	30.10	
2. Jusquiame (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc.	1er essai	42	10	1.20			
	2e essai	25	10	1.50			
3. Solution de saccharose à 1 %	1er essai	42	20	1.25			
	2e essai	25	20	1.50			
1. Rhubarbe (3 gr.) + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc.		45	5	8.30	2.85	11.40	Avec toluène, sans défécation.
2. Rhubarbe (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc. ..		45	5	5.20			
3. Solution de saccharose à 1 %		45	20	1.1			
1. Stramoine (3 gr.) + solution de saccharose à 1 % q. s. p. 100 cc.	1er essai	42	10	9.30	8.275	17.55	Le premier essai a été fait sans toluène ni défécation; le second avec toluène, en déféquant.
	2e essai	25	5	7.60	6.85	27.40	
2. Stramoine (3 gr.) + eau distillée q. s. p. 100 cc.	1er essai	42	10	0.40			
	2e essai	25	5	traces			
3. Solution de saccharose à 1 %	1er essai	42	20	1.25			
	2e essai	25	20	1.50			

Conclusions.

Toutes les drogues examinées (belladone, bourdaine, cascara, digitale, ipéca, jalap, jusquiame, rhubarbe et stramoine) renferment de la sucrase, et les feuilles apparaissent manifestement plus actives que les racines ou les écorces.

L'échantillon I de Jalap se montre bien peu actif : il en avait été de même dans la recherche de l'émulsine. On sait que la dessiccation des tubercules se fait ordinairement au-dessus d'un feu de bois vert, et la température ainsi atteinte peut donc, parfois, sinon détruire, du moins atténuer fortement les diastases.

Avec l'échantillon II, toutes choses égales d'ailleurs, les résultats sont meilleurs et la présence de la sucrase se manifeste nettement.

CHAPITRE III

RECHERCHE DE L'AMYLASE
(ou Diastase)

PAYEN et PERSOZ ne se bornèrent pas à l'étude de l'orge germé, dont ils avaient isolé la « diastase » (à laquelle DUCLAUX donna le nom d'amylase), et, dans des travaux ultérieurs, ils constatèrent l'existence de ce ferment soluble dans l'avoine, le blé, le maïs, le riz, ainsi que dans les tubercules de pommes de terre.

DUCLAUX a montré que l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum* le produisent en abondance. BOURQUELOT et HÉRISSEY l'ont trouvé dans divers champignons; MUSCULUS, GAYON et DUBOURG dans certains mucors; CALMETTE dans l'*Amylomyces Rouxii;* GRIMBERT dans le *Bacillus orthobutylicus;* LOBSTEIN dans le bacille tuberculeux.

Il se rencontre dans toutes les graines amylacées où son action se manifeste au moment de la germination; il existe également dans les feuilles de divers végétaux et surtout des légumineuses, ainsi que dans les bourgeons et les tubercules de beaucoup de plantes (Travaux de KOSSMANN et KRAUCH, de BROWN et MORRIS, de GREEN). ASTRUC et MOUSSERON l'ont signalé dans les graines de moutarde noire.

L'amylase est recherchée par son action sur l'emploi d'amidon qu'elle hydrolyse, donnant du maltose, sucre réducteur que l'on dose par la méthode de Bertrand :

$$(C^5H^{10}O^5)^n + \frac{n}{2} H^2O = \frac{n}{2} C^{12}H^{22}O^{11}$$

L'influence de la réaction du milieu sur l'amylase végétale a été étudiée par plusieurs auteurs : KJELDAHL, EFFRONT, MAQUENNE, ROUX, FERNBACH et SCHOEN..., tous ont observé qu'une très faible quantité d'acide libre augmente sensiblement la vitesse de la réaction diastasique, mais qu'il suffit de dépasser un peu cette dose optima pour constater une décroissance rapide de l'action de l'amylase. A la concentration de 0,001, l'acide chlorhydrique exerce déjà une action empêchante.

Comme pour la recherche de la sucrase, nous nous sommes bornée à mettre les drogues dans l'eau distillée en présence d'empois d'amidon.

Technique.

La technique est calquée sur celle de la sucrase.

1° Dans une fiole jaugée de 100 cc, on introduit 3 gr. de la drogue pulvérisée, très exactement pesés, 20 cc d'empois d'amidon récemment préparé (1), puis de l'eau distillée toluénée jusqu'au trait de jauge. On bouche, agite et place à l'étuve à 37°.

Deux autres fioles constituent les témoins :

---

(1) *Préparation de l'empois d'amidon :* 3 gr. de fécule sont délayés dans 20-25cc d'eau, dans un verre à pied, en agitant bien; chauffer à l'ébullition dans un matras 100-125cc d'eau et y verser, en agitant sans cesse, la suspension précédente d'amidon, de manière à avoir en tout 150cc.

2° Dans l'une on met exactement le même poids de la drogue (3 gr.) et on remplit jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée toluénée.

3° Dans l'autre, on introduit 20 cc d'empois et on complète à 100 cc avec de l'eau distillée toluénée.

Mêmes recommandations que pour la recherche de la sucrase : les trois fioles sont préparées et placées simultanément à l'étuve où elles restent rigoureusement le même temps. Après défécation effectuée comme précédemment s'il y a lieu, les dosages sont faits sur une portion convenable des liquides aussitôt la sortie de l'étuve et à la suite: après déduction des résultats 2° et 3° du résultat 1°, on a la réduction due à l'action de l'amylase sur l'empois d'amidon.

Résultats expérimentaux.

Les essais ont porté sur les mêmes drogues dans lesquelles avait été recherchée la présence de la sucrase. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau III.

Tableau III. — RECHERCHE DE L'AMYLASE

DROGUES EN ESSAI	Séjour à l'étuve	Volume prélevé pour le Dosage	Volume de liqueur $Mn^{0}4K$ réd.	Réduction due à l'amylase : pour le volume prélevé	Réduction due à l'amylase : calculée pour un prélèvement de 20 cc	OBSERVATIONS
		cc	cc	cc	cc	
1. Belladone (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée — 1er essai	26H	10	1.85	0.95	1.90	1er essai sans toluène ni défécation.
1. Belladone (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée — 2e essai	21	10	2.8	1.8	3.60	Deuxième essai avec toluène et défécation.
2. Belladone (3 gr.) + eau distillée..... — 1er essai	26	10	0.9			
2. Belladone (3 gr.) + eau distillée..... — 2e essai	21	10	1			
3. 20 cc. empois d'amidon + eau distillée..... — 2e essai	26	20	0			
3. 20 cc. empois d'amidon + eau distillée..... — 1er essai	21	20	0			
1. Bourdaine (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée	46	5	4.05	0.75	3	Avec toluène, sans défécation.
2. Bourdaine (3 gr.) + eau distillée.....	46	5	3.3			
3. Empois d'amidon 20 cc. + eau distillée.....	46	20	0			
1. Cascara (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée	46	5	2.95	0.70	2.80	Avec toluène, sans défécation.
2. Cascara (3 gr.) + eau distillée.....	46	5	2.25			
3. Empois d'amidon 20 cc. + eau distillée.....	46	20	0			
1. Digitale (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée	24	5	2.42	0.66	2.64	Avec toluène et défécation.
2. Digitale (3 gr.) + eau distillée.....	24	5	1.76			
3. Empois d'amidon 20 cc.						

DROGUES EN ESSAI	Séjour à l'étuve	Volume prélevé pour le Dosage	Volume de liqueur de MnO^4K réd.	Réduction due à l'amylase		OBSERVATIONS
				pour le volume prélevé	calculée pour un prélèvement de 20 cc	
1. Ipéca, échantillon I (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée	24 H	10 cc	2.5 cc	0	0	Poudre d'Ipéca fournie par la droguerie.
2. Ipéca (3 gr.) + eau distillée	24	10	2.5			
3. Empois d'amidon 20 cc. + eau distillée	24	20	0			
1. Ipéca, échantillon II (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée	24	10	2.85	0.10 cc	0.20 cc	Racine d'Ipéca pulvérisée au laboratoire.
2. Ipéca (3 gr.) + eau distillée	24	10	2.75			
3. Empois d'amidon 20 cc. + eau distillée	24	10	0			
1. Jalap, échantillon I (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée	26	10	8.4	1.45	2.90	Avec toluène, sans défécation.
2. Jalap (3 gr.) + eau distillée	26	10	6.95			
3. Empois d'amidon 20 cc. + eau distillée	26	20	0			
1. Jalap, échantillon II (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée	46	5	3.7	0.9	3.60	Avec toluène, sans défécation.
2. Jalap (3 gr.) + eau distillée	46	5	2.8			
3. Empois d'amidon 20 cc. + eau distillée	46	20	0			

Tableau III. — RECHERCHE DE L'AMYLASE (suite)

DROGUES EN ESSAI	Séjour à l'étuve	Volume prélevé pour le dosage	Volume de liqueur MnO^4K réd.	Réduction due à l'amylase		OBSERVATIONS
				pour le volume prélevé	calculée pour un prélèvement de 20 cc	
		cc	cc	cc	cc	
1. Jusquiame (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée	21 H	10	3.1	1.8	3.6	Avec toluène et défécation.
2. Jusquiame (3 gr.) + eau distillée	21	10	1.3			
3. Empois d'amidon 20 cc. + eau distillée	21	20	0			
1. Rhubarbe (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée	46	5	5.3	0.10	0.40	Avec toluène, sans défécation.
2. Rhubarbe (3 gr.) + eau distillée	46	5	5.2			
3. Empois d'amidon 20 cc. + eau distillée	46	20	0			
1. Stramoine (3 gr.) + 20 cc. empois d'amidon + eau distillée	26	10	1.35	0.95	1.90	Avec toluène et défécation.
2. Stramoine (3 gr.) + eau distillée	26	10	0.4			
3. Empois d'amidon 20 cc. + eau distillée	26	20	0			

Conclusions.

L'amylase existe dans les feuilles de belladone, de digitale, de jusquiame et de stramoine, dans l'écorce de bourdaine et de cascara, dans les tubercules de jalap ; mais nous n'avons pu la déceler dans l'ipéca, et elle semble être absente aussi de la rhubarbe, le faible résultat obtenu avec cette dernière étant de l'ordre des écarts expérimentaux. Pourtant l'ipéca est riche en amidon et de même la rhubarbe.

CHAPITRE IV

RECHERCHE DE LA MALTASE

Bourquelot a trouvé de la maltase dans l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum,* ainsi que dans le *Polyporus sulfureus.* Sa présence a été constatée dans les graines des céréales, germées ou non, et dans beaucoup de feuilles (feuilles de pommes de terre, de betteraves, de dahlias, etc...)

Pour la recherche de la maltase, on fait agir la drogue sur une solution titrée de maltose, et on vérifie s'il y a augmentation du pouvoir réducteur. Par hydrolyse, le maltose donne en effet deux molécules de glucose :

$$C^{12}H^{22}O^{11} + H^2O = 2\,C^6H^{12}O^6$$

Or, le pouvoir réducteur du glucose étant égal à 100, celui du maltose est égal à 66. Après hydrolyse, 100 gr. de maltose sont transformés en 105 gr. 26 de glucose; le pouvoir réducteur qui était 66 est devenu 105,26, c'est-à-dire qu'il se trouve augmenté, très approximativement, du simple au double.

L'étude de l'action des acides sur la maltase n'a pas été faite d'une manière très précise, sans doute à cause de la très faible quantité d'ions H qui suffit pour exercer une action nuisible.

D'après les recherches faites par Bodin et Rolants sur la maltase végétale et par Bierry sur la maltase contenue dans le suc pancréatique, cette diastase semble, suivant son origine, sur la limite des diastases favorisées par les acides et de celles agissant en milieu neutre.

Technique.

Elle est en tout semblable à la technique décrite pour la sucrase.

1° Dans une fiole jaugée de 100 cc., on introduit 3 gr. de la drogue, très exactement pesés, et une solution de maltose pur à 1 p. 100 jusqu'au trait de jauge. On bouche, agite et place à l'étuve à 37°.

Deux autres fioles servent de témoins :

2° Dans l'une on met exactement le même poids de drogue (3 gr.) et on remplit avec de l'eau distillée.

3° Dans l'autre, de la solution titrée de maltose à 1 p. 100.

Les précautions à prendre pour la rigueur des dosages sont les mêmes également. S'il y a de la maltase, le résultat 1° est supérieur à la somme des résultats 2° et 3°.

Résultats expérimentaux.

Les résultats expérimentaux sont réunis dans le Tableau IV.

Tableau IV. — RECHERCHE DE LA MALTASE

DROGUES EN ESSAI	Séjour à l'étuve	Volume prélevé pour le Dosage	Volume de liqueur MnO^4K réd.	Réduction due à la maltase : pour le volume prélevé	Réduction due à la maltase : calculée pour un prélèvement de 20 cc	OBSERVATIONS
1. Belladone (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 % ..	24 H	10 cc	6.80 cc	1.40 cc	2.80 cc	Avec toluène et défécation.
2. Belladone (3 gr.) + eau distillée.....	24	10	0.55			
3. Solution de maltose à 0,50 %.....	24	10	4.85			
1. Bourdaine (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 % ..	45	5	6.2	0.45	1.80	Avec toluène, sans défécation.
2. Bourdaine (3 gr.) + eau distillée.....	45	5	3.3			
3. Solution de maltose à 0,50 %.....	45	5	2.45			
1. Cascara (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 % ..	45	5	4.90	0.30	1.20	Avec toluène, sans défécation.
2. Cascara (3 gr.) + eau distillée.....	45	5	2.15			
3. Solution de maltose à 0,50 %.....	45	5	2.45			
1. Digitale (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 % ..	21	5	4.55	0.35	1.40	Avec toluène et défécation.
2. Digitale (3 gr.) + eau distillée.....	21	5	1.75			
3. Solution de maltose à 0,50 %.....	21	5	2.45			

Tableau IV — RECHERCHE DE LA MALTASE (suite)

DROGUES EN ESSAI	Séjour à l'étuve	Volume prélevé pour le Dosage	Volume de liqueur de MnO^4K réd.	Réduction due à la maltase		OBSERVATIONS
				pour le volume prélevé	calculée pour un prélèvement de 20 cc	
1. Ipéca, échantillon I (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 %	24 H	10 cc	7.9 cc	0.30 cc	0.60 cc	Poudre d'Ipéca fournie par la droguerie.
2. Ipéca (3 gr.) + eau distillée	24	10	2.5			
3. Solution de maltose à 0,50 %	24	10	5.1			
1. Ipéca, échantillon II (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 %	24	10	9.20	0.20	0.40	Racine d'Ipéca pulvérisée au laboratoire.
2. Ipéca (3 gr.) + eau distillée	24	10	4.10			
3. Solution de maltose à 0,50 %	24	10	4.90			
1. Jalap, échantillon I (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 %	26	10	12.5	0.55	1.10	Avec toluène, sans défécation.
2. Jalap (3 gr.) + eau distillée	26	10	6.9			
3. Solution de maltose à 0,50 %	26	20	10.1			
1. Jalap, échantillon II (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 %	45	5	5.7	0.45	1.80	Avec toluène, sans défécation.
2. Jalap (3 gr.) + eau distillée	45	5	2.8			

Tableau IV. — RECHERCHE DE LA MALTASE (suite)

DROGUES EN ESSAI	Séjour à l'étuve	Volume prélevé pour le dosage	Volume de liqueur MnO^4K réd.	Réduction due à la maltase		OBSERVATIONS
				pour le volume prélevé	calculée pour un prélèvement de 20 cc	
1. Jusquiame (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 % ..	26 H	10 cc	7.6 cc	1.05 cc	2.10 cc	Avec toluène et défécation.
2. Jusquiame (3 gr.) + eau distillée.....	26	10	1.5			
3. Solution de maltose à 0,50 %.....	26	20	10.1			
1. Rhubarbe (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 % ..	45	5	7.8	0.15	0.60	Avec toluène, sans défécation.
2. Rhubarbe (3 gr.) + eau distillée.....	45	5	5.2			
3. Solution de maltose à 0,50 %.....	45	5	2.45			
1. Stramoine (3 gr.) + solution de maltose à 0,50 % ..	26	5	3.15	0.50	2.	Avec toluène et défécation.
2. Stramoine (3 gr.) + eau distillée	26	5	0.20			
3. Solution de maltose à 0,50 %.....	26	5	2.45			

Conclusions.

Les drogues qui contiennent de l'amylase (feuilles de belladone, de digitale, de jusquiame, de stramoine, écorces de bourdaine et de cascara, tubercules de jalap) se sont montrées également pourvues de maltase.

Les faibles résultats donnés, à ce point de vue, par la racine d'ipéca et le rhizome de rhubarbe qui ont servi à nos expériences sont, ici encore, de l'ordre des erreurs expérimentales.

Ce sont toujours les feuilles qui, d'une façon générale, sont les plus actives.

CHAPITRE V

RECHERCHE DE L'UREASE

Découverte en 1878 par Musculus, dans une urine pathologique, l'uréase fut signalée par Miquel, en 1890, comme produite par divers microorganismes capables de décomposer l'urée en solution aqueuse, et c'est lui qui proposa le terme « uréase » pour cette enzyme. Schibata (1904) la trouva dans le mycélium du *Sterigmatocystis nigra,* et Kossovicz (1912) dans d'autres moisissures. Goris et Costy ont constaté sa présence dans un grand nombre de champignons supérieurs (Basidiomycètes et Ascomycètes), mais elle n'a pu être décelée dans le genre Amanita, Lepiota, Lycoperdon : son absence serait corrélative de la présence de l'urée qui se montre en proportion variable selon les espèces (0,34 à 9,25 p. 1000 du poids du champignon frais), et aussi suivant les stades de l'évolution. Chez les plantes vertes, on l'a rencontrée principalement dans les graines riches en matières protéïques.

C'est en 1909, que Takeuchi montra qu'un extrait aqueux de farine de soja (*Glycina hispida,* légumineuse très répandue au Japon), possédait au plus haut degré le pouvoir de décomposer l'urée, et quelques années plus tard la présence de l'uréase fut identifiée chez un grand nombre de légumineuses.

En 1916, Mateer et Marshall constatèrent que la

graine de *Canavalia gladiata*, et, en particulier, la fève Saint-Jacques (*Canavalia ensiformis*) renfermaient encore beaucoup plus de ferment que le soja.

L'uréase transforme l'urée en carbonate d'ammoniaque.

$$CO(NH^2)^2 + 2\,H^2O = (NH^4)^2CO^3$$

D'après les recherches de Miquel (1897), les acides non seulement entravent l'action de l'uréase, mais même arrivent à la détruire. Ainsi les acides sulfurique et chlorhydrique ont arrêté toute hydrolysation à des doses de 1/40000; les acides organiques, citrique, lactique, tartrique, à la dose de 1/500.

Cette diastase est de même très sensible aux alcalis.

Technique.

La technique de la recherche de l'uréase, basée sur la réaction ci-dessus, est simple :

1° La drogue en essai (3 gr.) est mise dans un flacon avec 50 cc de solution d'urée à 2 gr. 50 p. 100 (dans eau toluénée).

2° Un flacon témoin renferme la même quantité de drogue, mais avec 50 cc d'eau distillée toluénée.

3° Un autre flacon témoin renferme simplement 50 cc de la solution d'urée.

Au bouchon de chacun des trois flacons est fixé un papier rouge, humide, de Tournesol, qui pend dans l'atmosphère du flacon, — et les trois flacons sont placés à l'étuve à 37°.

Le carbonate d'ammoniaque formé sous l'action de l'uréase provoque le virage au bleu du papier de tournesol, les papiers des témoins demeurant rouges.

Résultats expérimentaux.

Nos essais ont porté sur les drogues ayant fait l'objet de précédentes recherches, mais en outre sur la graine de jéquirity, la fève de Calabar et l'arachide, toutes trois appartenant à la famille des légumineuses, dont certaines espèces sont riches en uréase, ainsi que nous l'avons rappelé.

Les essais furent tous négatifs, sauf précisément avec le jéquirity et l'arachide, la graine de celle-ci se montrant d'ailleurs beaucoup plus active que le péricarpe.

Mais les fèves de Calabar en essai se sont montrées privées d'uréase.

CHAPITRE VI

RECHERCHE DES DIASTASES OXYDANTES

Nous avons déjà, dans l'introduction, rappelé l'existence de diastases oxydantes dans le suc de *Rheus vernicifera* et *succedanea,* la gomme arabique, la myrrhe, le caoutchouc. Elles ont été observées surtout dans les Lactaires et les Russules (BOURQUELOT et G. BERTRAND), mais elles existent dans beaucoup de végétaux, phanérogames comme cryptogames (tubercule de pomme de terre, dahlia, racines de betterave, pommes, poires, coings, mercuriale, beaucoup d'ombellifères, de borraginées, de crucifères, etc...), et on sait que des colorations spéciales de sucs ou de tissus, la formation de l'Indigo, le développement du parfum de la vanille, et beaucoup d'autres phénomènes, sont dus à des diastases oxydantes.

La propriété particulière des diastases oxydantes est de provoquer l'oxydation des corps facilement oxydables, en fixant sur le corps soit l'oxygène de l'air (oxydases), soit l'oxygène d'un peroxyde, comme l'eau oxygénée (peroxydases).

Les oxydases et peroxydases sont paralysées par les acides et d'après les recherches de G. BERTRAND et ROSENBAND, BACH et SBARSKY, cette action nuisible est proportionnelle au degré de dissociation.

Vis-à-vis de la laccase, G. Bertrand rangeait les acides en deux groupes : tous ceux qui ont une action acide à l'hélianthine entravent ou paralysent son action, même à des doses extrêmement faibles; ceux qui n'influencent pas cet indicateur (ac. carbonique, borique, sels acides comme phosphate monopotassique, citrate bisodique, etc...) sont presque sans action, même à dose élevée.

Elles n'agissent qu'en présence d'une petite quantité d'ions OH. L'action favorisante de ceux-ci a fait particulièrement l'objet d'études très intéressantes de Dony Hénault. Cet auteur, cherchant à réaliser synthétiquement un corps ayant les propriétés de la laccase, a constaté que, conformément aux vues de Bertrand, l'intervention d'un composé manganeux représente la partie pour ainsi dire spécifique de la diastase, mais il admet que c'est l'ion OH qui, par son couplage avec le sel manganeux, en exalte les propriétés oxydantes.

Chodat et Bach ont récemment émis l'hypothèse qu'il y avait dans les plantes à oxydases deux composés distincts . un peroxyde et une peroxydase. L'oxydation se ferait en deux temps :

1° Formation du peroxyde organique qui serait dû à une oxydénase.

2° Décompostion rapide de ce peroxyde organique par la peroxydase, mise en liberté d'oxygène atomique actif, seul capable d'agir sur la teinture de gaïac qui remplirait le rôle d'accepteur.

Si le peroxyde n'existe pas naturellement dans la plante, la peroxydase ne peut donner d'oxygène atomique, il est alors nécessaire, pour obtenir la coloration bleue, d'ajouter un peroxyde tel que H^2O^2.

Quoi qu'il en soit, pour mettre les diastases oxydantes en évidence, on choisit parmi les corps facilement oxydables, certains composés phénoliques qui, oxydés, donnent des dérivés colorés caractéristiques (1) :

Tels sont :

Le naphtol α.
La benzidine.
Le pyramidon.
L'hydroquinone.
La paraphénylène diamine.
La résine de gaïac.
Le gaïacol.

Nous avons utilisé principalement la teinture de résine de gaïac et le gaïacol.

Technique.

L'eau de macération de la drogue pulvérisée (10 cc environ) est additionnée de teinture fraîche de gaïac (1 cc.): en présence de diastase oxydante il se produit une coloration bleue, soit directement (oxydase), soit après addition de 1 ou 2 gouttes d'eau oxygénée (peroxydase). Le dérivé bleu que se forme (gaïaconoside ?) résulterait de l'oxydation de l'acide gaïaconique existant dans la résine de gaïac, mais est mal défini.

La matière colorante bleue formée est peu stable; elle est décomposée par la chaleur, ainsi que par différents réactifs chimiques : il suffit d'une faible acidité ou d'une faible alcalinité pour empêcher la coloration de se pro-

1) G. Bertrand a observé que la laccasse produit l'oxydation des corps de la série benzidinique qui possèdent au moins 2 groupements OH ou NH2, lorsque ces groupements occupent la position para ou ortho. Les méta sont à peine attaquables.

duire, et il s'ensuit qu'il est nécessaire de prendre quelques précautions quand on se sert de ce réactif. Il est bon de neutraliser d'abord l'eau oxygénée qu'on emploie, car cette eau est généralement très acide; neutraliser aussi le liquide contenant la diastase lorsqu'il est franchement alcalin ou franchement acide. (A noter toutefois que la coloration produite par l'acide gaïaconique n'est pas détruite par l'acide acétique).

Avec le gaïacol, la réaction est plus fidèle et très sensible.

A 10 cc de solution aqueuse de gaïacol à 1 p. 100 (faite à chaud) on ajoute 3 à 4 cc de l'eau de macération : le liquide se colore peu à peu en rose, puis en rouge, directement ou après addition d'eau oxygénée, par suite de production de tétragaïacoquinone rouge :

$$4\,C^6H^4\begin{cases}OH\\OCH^3\end{cases} + O^2 = \left(C^6H^4\begin{cases}O\\OCH^3\end{cases}\right)^4 + 2\,H^2O$$

Réactions témoins. — En cas de résultats positifs, les mêmes réactions sont répétées avec l'eau de macération préalablement bouillie : aucune coloration ne doit apparaître.

Résultats expérimentaux.

Les résultats expérimentaux sont réunis dans le Tableau V.

Tableau V. — Recherche des diastases oxydantes.

Drogues en Essai	Résultats	Observations
Belladone (feuille)	—	La recherche a été faite avec le Gaiacol, et les résultats positifs ont été obtenus après addition de H^2O^2 2 croix indiquent une coloration rouge ; 1 croix indique une coloration rosée.
Bourdaine (écorce)	—	
Cascara (écorce)	—	
Cevadille (graines)	—	
Ciguë (graines)	+	
Colchique (graines)	++	
Colchique (bulbe)	+	
Coloquinte (sans les graines)	—	
Digitale (feuille)	—	
Fève de Calabar	++	
Fève de St-Ignace	—	
Fougère mâle (rhizome)	+	
Ipéca (racine)	—	
Iris (rhizome)	—	
Jalap (racine), échantillon II	—	
Jusquiame (feuille)	—	
Kola (graine)	+	
Noix vomique	++	
Quinquina rouge	—	
Rhubarbe (rhizome)	—	
Séné (foliole)	—	
Stramoine (feuille)	—	

On voit que les résultats nettement positifs ont été obtenus avec les graines (graines de ciguë, de colchique, fèves de Calabar, noix de kola, noix vomique). Le bulbe de colchique a bien donné une réaction positive, mais beaucoup moins nette que les graines de cette drogue; de même le rhizome de fougère n'a donné qu'une faible réaction.

CONCLUSIONS GENERALES

Des recherches que nous avons faites, il ressort que dans chaque plante étudiée existent de nombreux ferments. En particulier la présence de l'émulsine est très généralisée et certaines drogues en renferment qui, d'autre part, ne contiennent, du moins dans l'état actuel de nos connaissances, ni glucosides, ni complexes sur lesquels elle ait à agir. D'ailleurs, l'exemple des amandes douces renfermant de l'émulsine sans amygdaline est classique, et nous savons que maintes moisissures et bactéries secrètent un luxe de ferments qui ne leur sont d'aucune utilité.

Dans certaines poudres du commerce, les diastases peuvent être atténuées, sinon détruites, par la température à laquelle eut lieu la dessiccation. La lumière, même diffuse, peut, à la longue, atténuer aussi les diastases; le temps seul ne paraît pas les détruire : certaines poudres essayées, et qui ont donné des résultats positifs, existaient en effet dans le droguier depuis plus de cinquante ans.

Nous constatons que l'activité des ferments est plus grande dans les feuilles que dans les autres parties de la plante : racines, rhizomes, tubercules, écorces. On pouvait d'ailleurs le prévoir, la feuille élaborant les substances nutritives grâce à des diastases et à la fonction chlorophyllienne.

Pendant la dessiccation, qui s'opère parfois au voisinage de la température optima d'action des diastases, cel-

les-ci, émigrant de leurs cellules, peuvent oxyder, hydrater ou dédoubler les complexes alcaloïdiques, glucosidiques et autres principes actifs que la drogue renferme. Naturellement, l'action est plus rapide et plus intense si la pulvérisation ou le broyage ont mis en contact intime l'agent fermentaire et le principe attaquable.

Or, depuis longtemps, on a constaté des différences sensibles dans l'action thérapeutique des plantes médicinales, suivant que l'on emploie la plante fraîche ou séchée, l'une de ses préparations galéniques ou les principes actifs qu'on en retire.

Perrot et Goris, travaillant notamment sur le marron d'Inde, la noix fraîche de kola, la digitale, ont cherché et réussi à obtenir des produits ayant même action thérapeutique que le végétal vivant.

Déjà, en 1898, Bourquelot avait écrit pour la noix de Kola : « On peut, en prenant quelques précautions, obtenir avec les noix de kola fraîches, un extrait complètement blanc. Il faut pour cela commencer par détruire le ferment oxydant qu'elles renferment. On y arrive en découpant les noix dans de l'alcool à 95° préalablement porté à l'ébullition. On distille ensuite la liqueur alcoolique ainsi obtenue dans le vide avec rentrée d'hydrogène. On active la dessiccation dans le vide au-dessus de l'acide sulfurique et on pulvérise. Le produit a tout à fait l'apparence de la poudre de gomme arabique. Cet extrait n'abandonne presque pas de caféïne au chloroforme. Elle est restée, comme dans la plante fraîche, combinée au chromogène et à du glucose (probablement la Kolatine de Knebel) .»

Mais le procédé ainsi indiqué par Bourquelot est difficilement réalisable dans l'industrie : il porte avec lui certains inconvénients plus ou moins notables, selon les

plantes ou parties de plantes médicinales à traiter. (P. ex. les noix de Kola fraîches renfermant 50 à 60 p. 100 d'eau, il en résulte que dans le traitement à l'alcool bouillant, le titre de l'alcool se trouve rapidement diminué; or, il est de toute nécessité pour obtenir un bon extrait, que le degré alcoolique de la solution à la fin de l'opération ne soit pas descendu au-dessous de 70°. D'autre part, cette méthode dissout certains produits et la noix ainsi stérilisée est impropre à toute recherche scientifique ultérieure.)

Pour qu'un agent stabilisant puisse entrer dans la pratique industrielle, il est désirable qu'il réalise les trois conditions suivantes :

1° Qu'il soit bon marché;

2° Qu'il soit facile à manipuler;

3° Qu'il soit efficace à température modérée.

Perrot et Goris eurent l'idée d'utiliser la stérilisation à l'autoclave : le procédé est plus simple, plus rapide et la quantité de liquide mise en œuvre est minime. En traitant ainsi les plantes fraîches par les vapeurs d'alcool sous faible pression, à une température inférieure à 100°, les auteurs obtinrent des plantes parfaitement fixées non seulement dans leur aspect extérieur, mais encore dans leur composition.

Dans certains cas, et lorsqu'il n'importe nullement de conserver les drogues avec leur aspect, on peut employer également la vapeur d'eau; la technique est facile : par exemple « les noix de Kola entières ou ouvertes suivant la fente cotylédonnaire sont disposées dans des paniers en fil de fer. On chauffe un autoclave à 100° et on laisse fluer abondamment la vapeur. On introduit alors les paniers et, le couvercle étant revissé, on purge l'appareil d'air. On élève la température à 110° et on la maintient

cinq à dix minutes, suivant la quantité de graines introduites ». (Perrot et Goris).

Ce procédé donne d'excellents résultats pour les tissus mucilagineux, les racines épaisses et les graines. Il n'est pas applicable aux parenchymes riches en amidon qui donnent un empois. A la dessiccation celui-ci se transforme en une masse cornée très dure à pulvériser.

Dans le cas de tissus fragiles comme les feuilles, ce procédé n'est applicable qu'en prenant des précautions délicates et après quelques modifications : il se produit en effet facilement un éclatement des cellules par la vapeur d'eau, avec libération du contenu cellulaire.

Ce procédé a été industrialisé par les laboratoires Boulanger-Dausse.

En juin 1927, Varcovici, sous la direction de Jonesco-Matu, utilisa dans ses expériences, comme agents stabilisants, des corps gazeux ou liquides se volatilisant à basse température de façon à altérer le moins possible le contenu cellulaire. Il a employé quelques carbures d'hydrogène et leurs dérivés halogénés : méthane, acétylène, chlorure d'éthyle et tétrachlorure de carbone.

Pour étudier l'action du méthane, il emploie la technique suivante :

Dans une cornue chauffée au bain de sable, il met de l'acétate de soude et de la chaux sodée. La cornue est en communication par un raccord de caoutchouc et un tube en verre avec un vase de verre fermé soigneusement par un couvercle d'amiante. Le tube en verre va jusqu'au fond du vase qui est muni d'un autre tube pour la sortie du gaz. Dans ce vase on met par couches jusqu'à 2 kg. de plantes fraîches. Le vase et la cornue sont sur des sup-

ports permettant de les chauffer à une température inférieure à 50° en général.

Pour l'étude de la stabilisation par l'acétylène, la cornue était remplacée par un générateur d'acétylène à partir du carbure de calcium.

Les dérivés halogénés de ces carbures, chlorure d'éthyle et tétrachlorure de carbone, doivent être rejetés, car ils exercent, au point de vue morphologique, une action très nette sur le contenu cellulaire des plantes traitées.

Varcovici constate que l'acétylène a un rôle stabilisant remarquable en opérant à température ordinaire ou à celle du bain marie. Il a étudié comparativement les variations de teneur en alcaloïdes des extraits et teintures de belladone et jusquiame obtenus avec des plantes non stabilisées et avec des plantes stabilisées. Le dosage des alcaloïdes a été effectué au moment de la préparation, un et plusieurs mois après, et ainsi de suite jusqu'à un an. Il constate que ces préparations galéniques se maintiennent sans variations pendant les cinq premiers mois. Ensuite, il y a une diminution de la teneur en alcaloïdes, mais très faible, beaucoup plus faible d'ailleurs quand la stabilisation a été opérée au moyen de l'acétylène que lorsque le chlorure d'éthyle ou le méthane ont été les agents stabiliseurs.

De l'étude de Varcovici, il résulte que la stabilisation des plantes fraîches par l'acétylène, avec utilisation des matières premières ainsi obtenues à la préparation de certaines formes galéniques, donne d'aussi bons résultats que la stabilisation à l'alcool.

Cette stabilisation des drogues par destruction des diastases leur assure une action physiologique constante,

semblable à celle de la plante fraîche : les glucosides demeurent intacts, les tannoïdes ne sont pas oxydés, les complexes alcaloïdiques ne sont pas détruits, — toutes choses que n'assuraient ni la dessiccation la plus minutieuse et la plus étudiée, ni la conservation ultérieure la plus soignée.

A la séance de l'Académie de Médecine du 19 avril 1932, le Professeur PERROT, présentant les comptes rendus du IVe Congrès international des plantes médicinales, tenu à Paris en juillet 1931, a exposé deux vœux adoptés par ce Congrès, tendant l'un à encourager la propagande scientifique pour remettre en honneur la phytothérapie, l'autre à réaliser la normalisation des drogues végétales.

Certes, la pharmacie chimique qui procure aux médecins des corps bien définis à action connue et toujours semblable, a fait abandonner progressivement la phytothérapie, c'est-à-dire la médication galénique végétale. Il semble toutefois que cette dernière ait été inconsidérément dédaignée et qu'après une période d'engouement pour la médication chimique, bien des thérapeutes déplorent le trop grand abandon des « simples » et souhaitent la renaissance de la phytotérapie. On a reconnu en effet que la drogue végétale ou son extractif n'agissent pas exactement comme le principe actif chimique qu'on en retire, et que leur emlpoi est souvent plus avantageux : il suffit de rappeler, à titre d'exemple, l'action respective des poudres ou infusés de digitale et de la digitaline. Mais pour rendre au médicament galénique toute sa valeur, il faut lui assurer la constance d'action qui lui a manqué jusqu'ici. Nul doute que la stabilisation, qui détruit les diastases et, partant, soustrait les végétaux à toutes les

altérations susceptibles de modifier les principes actifs naturels, comme le confirme l'essai chimique et physiologique, réalise un progrès considérable pour l'avenir de la phytothérapie.

BIBLIOGRAPHIE

Ouvrages consultés

ACHALME : Electronique et Biologie. Masson éditeur. Paris 1913.

ARTHUS : La Nature des Enzymes. *Thèse Doct. Méd.* Paris, 1896.

AUBEL et GENEVOIS : L'état actuel de la question des ferments. *Mémorial des Sciences physiques,* Fasc. VII. Gauthier-Villars, édit. Paris 1929.

BEILLE : Précis de Botanique pharmaceutique. Maloine édit. Paris, 1925.

BERTRAND G.: *Bull. Soc. Chim.* T. XI, p. 718, 1894; T. XIII, p. 362, 1895; T. XV, p. 1218, 1896; T. XVII, p. 623, 1897; T. XXXV, p. 1285, 1906.
Revue générale des Sc. T. XVI, p. 459, 1905.

BOURQUELOT : Les Ferments solubles. *Soc. d'Editions scientifiques.* Paris, 1896.

BRIDEL : Réflexions sur les diastases et leur spécificité. *Bull. de la Soc. Chim. biologique,* T. 8, p. 170, 1926.

COLIN HENRI : Les Diastases. T. I, les Hydrolases. G. Doin, édit. Paris, 1931.

COMBES : La vie de la cellule végétale, T. I, Arm. Colin, édit. Paris, 1927.

DUCLAUX E. : Traité de Microbiologie, T. II, Masson, édit. Paris, 1899.

Duclaux J. : La chimie de la cellule vivante. Alcan, édit. Paris, 1910.

Effront : Les Enzymes et leurs applications. Carré et Naud, édit. Paris, 1899.

Goris : Localisation et rôle des alcaloïdes et glucosides. Lechevalier, édit. Paris, 1914.

Henri V. : Lois générales de l'action des diastases. Hermann, édit. Paris, 1903.

Hérissey : Les Glucosides. *Bull. Soc. chim.* T. XXXIII, p. 349, 1923.

Jonesco-Matiu : Essais de stabilisation des plantes médicinales par l'action de quelques hydrocarbures. *Chimie et Industrie.* Vol. 21, n° 2 *bis,* p. 498, 1929.

Lobstein : Biochimie du bacille tuberculeux. *Thèse Doct. ès Sc.,* 1922.

Maurin : La richesse des différents sénés en dérivés anthracéniques. *Bull. Sc. pharmacol.* T. XXIX, p. 617, 1922.

Molliard : Nutrition de la plante, vol. 3. *Encyclop. Scient.* Doin, édit. Paris, 1923.

Oppenheimer : Lehrbuch der Enzyme. Leipzig, 1927.

Perrot : La stérilisation des plantes médicinales dans ses rapports avec leur activité thérapeutique. *Bull. des Sc. pharmacalogiques,* T. XVI, p. 381, 1909.

IV^e^ Congrès international des plantes médicinales et des plantes à essences, 1931. (Mémoire édité par le Comité français de la Fédération, 12, avenue du Maine, Paris.)

Thomas : Les diastases. Méthodes de recherches et procédés d'étude. *Bull. Institut Pasteur.* T. VII, p. 41, 1909.

TSCHIRCH : Handbuch der Pharmakognosie. Tauchnitz, édit. Leipzig, 1909-1925.

VARCOVICI : Essais de stabilisation des plantes médicinales par l'action de quelques hydrocarbures. *Chimie et Industrie*. Vol. 21, n° 2 *bis*, p. 498, 1929.

Vu et bon à imprimer

Strasbourg, le 7 Décembre 1932.

Le Président du Jury

J. E. LOBSTEIN.

Vu et approuvé

Strasbourg, le 8 Décembre 1932

Pour le Doyen de la Faculté de Pharmacie

l'Assesseur

A. SARTORY.

Vu et permis d'imprimer

Strasbourg, le 12 Décembre 1932

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

J. DRESCH.

TABLE DES MATIERES

	Pages
Avant-propos.	5
Introduction.	9
Chapitre premier. — Recherche de l'émulsine..	26
Chapitre II. — Recherche de la sucrase.....	32
Chapitre III. — Recherche de l'amylase.....	40
Chapitre IV. — Recherche de la maltase	47
Chapitre V. — Recherche de l'uréase	53
Chapitre VI.— Recherche des diastases oxydantes	56
Conclusions générales.	62
Index bibliographique	69

1933 - Paris .— Imp. Lecot, 38, r. St-Sabin